

二甲基亚砜对生物膜的作用机理

方志聪¹, 戚智²

1. 西昌学院汽车与电子工程学院, 四川西昌 615013;

2. 厦门大学医学院生理系, 福建厦门 361005

收稿日期: 2012-03-23; 接受日期: 2012-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070741, 81000560)

通讯作者: 方志聪, 电话: (0834)2580103, E-mail: fangzc@sohu.com

戚智, 电话: (0592)2181330, E-mail: qizhi@xmu.edu.cn

摘要: 二甲基亚砜被广泛应用于生物、化学和药学领域, 这些应用大多与其增加生物膜的通透性、促进活性分子跨膜传输的作用密切相关。本文对二甲基亚砜增加生物膜通透性的理论及实验研究做简要综述, 主要强调二甲基亚砜在生物膜中诱导水性孔道形成的分子动力学模拟及其相关的实验研究。

关键词: 生物膜; 二甲基亚砜; 离子通透性; 水性孔道

中图分类号: R966

DOI: 10.3724/SP.J.1260.2012.20046

引言

二甲基亚砜 [dimethyl sulfoxide, DMSO, 分子式 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$] 具有一个亲水的亚硫酰基和两个疏水的甲基, 因此, 它既可溶于水溶液也可溶于有机溶剂。这些物理化学性质使 DMSO 成为疏水化合物的高效溶剂及氢键结构的破坏剂。

DMSO 作为药物辅助治疗剂、细胞冷冻保护剂、生物膜融合剂和膜渗透剂, 已被广泛应用于生物、化学和药学领域^[1,2]。这些应用大部分都与 DMSO 具有增加生物膜通透性的能力密切相关。DMSO 对皮肤有极强的渗透性, 有助于药物向人体渗透, 可增加药物吸收而提高疗效。多种药物溶解在 DMSO 中, 不需口服和注射, 涂在皮肤上就能渗入体内, 开辟了给药新途径^[3]。对细胞膜的通透性是细胞冷冻保护剂需要满足的重要条件之一^[4]。DMSO 能够快速穿透细胞膜进入细胞中, 延缓冻存过程, 减少细胞内冰晶的形成, 有利于减弱冷冻及融化过程中细胞剧烈的渗透压变化对细胞造成的伤害, 保持细胞膜的完整性, 是目前最好的细胞冻存保护剂之一^[4,5]。作为膜渗透增强剂, DMSO 在膜与膜交界的区域定位, 可以降低溶质分子跨膜被动扩散所需要的活化能, 引起脂质双分子层厚度的减小, 促进溶质分子透过细胞膜。DMSO 还可作为膜融合剂诱导细胞融合^[6]。作为细胞膜融合剂, DMSO 可促进膜与膜之间的紧密接触, 并诱导脂质融合中间体启动正在融合的膜成分的分子重排。细胞融合的一个关键步骤是细胞双层膜上最接近的两邻近外膜的合并。DMSO 在双层膜上

诱导的孔道，将对最接近的两邻近外膜的结构产生扰动，可极大地加速两邻近外膜中脂类的混合。

综上所述，研究 DMSO 对生物膜作用的分子机制，有助于更好地发挥其生物学作用。本文将从实验和理论研究两方面，综述 DMSO 对细胞膜通透性的影响。

DMSO 对细胞膜通透性的影响

DMSO 可显著增加细胞膜的通透性

多年前，人们就已发现 DMSO 可以增加物质的通透性，帮助活性分子穿过生物膜^[1,7]。近期的研究进一步证明了 DMSO 增强物质通透性的能力。与 DMSO 共同孵育后，外源 DNA 的转染效率较空白对照组有明显提高^[8]。作为一个化学渗透增强剂，DMSO 被用作药物载体来促进药物扩散进入皮肤^[3,9-12]。在 DMSO 的协助下，富含精氨酸的多肽进入细胞的效率有显著增加^[13]。X-射线衍射研究发现，在 DMSO 的作用下，脂质分子头部基团的分布密度增加，脂质双分子层厚度减小^[14]。脂双层厚度的减少使溶质分子跨膜所需的活化能降低，可在一定程度上解释 DMSO 增加生物膜通透性的能力。

DMSO 增加细胞膜通透性的分子动力学模拟

DMSO 的广泛应用引起了人们对它作用机理的极大兴趣，开展了多种形式的分子动力学模拟。早期的分子动力学模拟提示，DMSO 聚集于膜-水相交界区域，部分替代了其中的水分子，减少了脂双分子层的静电势能及水合作用力，使脂分子间的相互排斥力减少，脂双分子层更靠近，厚度减小^[15]。

对二棕榈酰磷脂胆碱 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC) 脂双层 / 水系统的分子动力学模拟显示了 DMSO 作用于脂双层的更多细节，DMSO 分子几乎不与脂分子的头部基团发生相互作用，趋向于滞留于头部基团的正下方，可比水分子更深地穿透入生物膜，使头部基团所占面积显著增加^[16]。为节省计算空间并进行较长时间 (0.8 s) 的模拟，研究者们采用了将多个原子由一个粒子表示的粗粒化尺度的分子动力学模拟方法，对 DPPC 构建的生物膜进行了模拟，进一步证明了在小于 20% 摩尔百分比浓度范围内，DMSO 分子可进入到脂双层结构内部，滞留于脂分子头部基团的正下方，像楔子一样嵌入脂分子间，推动脂分子头部基团相互离开，减少脂双层厚度，使脂分子每个头部基团所占据的面积增加，使脂分子的尾部区域也变得松弛，尾部基团可扩展而占据更大的体积，显著减少双层膜的面积压缩模量及膜的刚性弯曲度，并诱导水性孔道的形成。值得一提的是，0.8 s 粗粒化尺度的分子动力学模拟首次观察到 27% 摩尔百分比浓度的 DMSO 可在双层膜上诱导水性孔道的形成。水性孔道的形成缘于脂双层膜波动引起对向的两个脂分子深入到脂双层内部，随后，在脂分子头部基团的帮助下，水分子开始进入脂双层，DMSO 分子也进入脂双层并引起更多的水分子进入，直至形成连续的水分子链。此时，脂分子重新排列，形成沙漏型孔道，该孔道迅速延伸到一定尺寸后形成相对稳定的孔道。DMSO 诱导水性孔道的形成，可能是其增加膜通透性的分子机制。这些亲水性孔道由脂分子的亲水性头部所包围，其中充满水分子^[17]。

粗粒化尺度的分子动力学模拟虽然可提高计算效率,延长模拟时间,但它不能在单个原子水平进行模拟,可能会丢失一些重要细节。随着计算水平的提高,使得在原子水平对 DMSO 与生物膜的相互作用进行较长时间的分子动力学模拟成为可能。通过对生物膜的分子动力学模拟发现,DMSO 对细胞膜起什么作用取决于它的浓度。低浓度的 DMSO 可透入脂和水的界面,像楔子一样插入膜脂分子之间,增加脂分子间的平均距离、扩展其面积、减小其厚度。对脂双层的横向扩展使得脂分子头部发生重排,引起脂酰链序列性降低及膜的流动性增加。随着 DMSO 浓度的进一步增加,双层脂膜继续扩展,并伴随着脂分子头部基团相互作用的减少和脂双层厚度的减少,使得双层脂膜的结构容易受到热扰动的影响,脂-水相的结构容易受到破坏。DMSO 分子数量在脂-水相进一步的增加,驱使其开始出现在双层脂膜的内部,并与脂酰链发生相互作用,有效屏蔽掉其疏水性。这些效应为水分子进入膜内部创造了条件,导致在膜内部形成瞬时水柱。计算机模拟可观察到这些瞬时水柱自发地延伸至整个双层膜,并在几皮秒内消失。由于大量水分子间形成的氢键,其中一些包含较多水分子的相对较大的水柱,随着时间的延伸可在膜内稳定较长时间,使水分子出现在脂双层的疏水性核心,最终导致脂分子头部基团的重新分布,使脂分子的头部基团从脂-水相表面移动到双分子层内部,包围并稳定瞬时水柱,从而在双层脂分子中形成瞬时的跨膜水性孔道(图 1)^[18]。在含有 10% 摩尔百分比浓度 DMSO 及 KCl 溶液的脂双层膜系统中,通过分子动力学模拟不仅观察到了水性孔道的形成,还发现 K^+ 粒子及 Cl^- 粒子均可穿过该水性孔道^[19]。

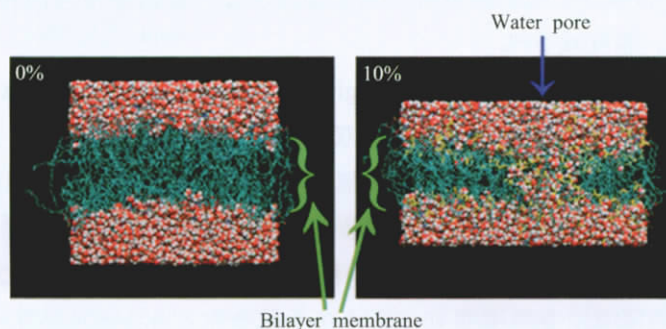


图 1 DMSO 浓度依赖性地作用于脂双层膜 图中所示为分子动力学对含有 0 及 10 摩尔百分比浓度 DMSO 的脂双层膜模拟的最终结构。青色代表脂双层膜,红色代表水分子,黄色代表 DMSO 分子(根据文献 18 修改)

Fig.1 Concentration dependent action of DMSO on lipid bilayer membranes Presented are side views of the final structures of molecular dynamics simulations for the bilayer systems containing 0 and 10 mol% of DMSO. Lipids are shown in cyan, water in red, and DMSO in yellow (modified according to Ref 18)

神经酰胺是皮肤角质层的主要脂分子,为了解 DMSO 可增加皮肤通透性的分子机制,Barry^[20]对 DMSO 在神经酰胺脂双层的作用进行了分子动力学模拟,发现在含有低浓度 DMSO 的脂双分子层中,神经酰胺的密度曲线与没有 DMSO 的脂双分子层并没有显著的不同。随着 DMSO 浓度的增加,水分子密度曲线显示水-脂界面逐渐偏离双分子层表面,说明与神经酰胺头部基团相互作用的水分子逐渐被 DMSO 所替代。在脂-水界面,DMSO 密度曲线出现显著的峰值,揭示 DMSO 有向脂-水界面聚集的趋势。这种聚集现象在低浓度

的 DMSO 时更显著, 此时, DMSO 的密度曲线显示 DMSO 在液相中密度较小, 而在脂 - 水界面有显著的峰值, 提示 DMSO 趋向于替代水分子而聚集在脂 - 水交界处。随着 DMSO 浓度的增加, 其在液相的密度发生变化, 而峰值密度并不改变, 说明 DMSO 在脂 - 水界面的浓度有一个饱和度, 限制了其浓度的进一步提升, 且该饱和度在低浓度 DMSO 时即已达到^[21]。当 DMSO 浓度达到一定值后, 神经酰胺间的氢键结构变弱, 引起双层膜流动性增加, 双层膜脂的脂分子头部及 DMSO 分子开始向脂双层的中心移动, 内外膜的脂分子头部逐渐接触, 将脂分子的疏水性尾部包围起来, 形成亲水性孔道。由于线张力的减少, 亲水性孔道逐渐扩大, 水分子迅速进入亲水性孔道, 形成可转运亲水性小分子的通路^[22]。X-射线衍射对 DPPC 双层膜的测量结果早已证明, DMSO 可以穿入磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 头部极性基团之间, 增加单个脂分子所占据的面积, 减少膜厚度^[14]。该结果与以上分子动力学模拟观察到的现象非常一致, 说明了分子动力学模拟的可靠性。

总结及展望

长期以来, 如何解释 DMSO 促进亲水性分子 (特别是无机盐类离子) 透过生物膜一直不清楚。在分子机制上至少存在三种可能来解释离子的跨膜转运。第一种机制, 离子的跨膜转运主要是由特定的蛋白质介导, 例如离子通道、转运体和离子泵 (Na^+/K^+ 泵等); 第二种机制, 离子的跨膜转运可由相似相容扩散原理解释。该原理暗示需要离子扩散到膜的疏水核心才能实现其跨膜扩散^[23]; 第三种机制就是离子通过生物膜上的瞬时水性孔道进入胞内, 水性孔道能帮助离子避开跨膜扩散所需克服的高能障^[24,25]。虽然以上三种机制都可能起作用, 但是如下的证据提示, 离子的跨膜转运主要是通过 DMSO 在细胞膜上诱导出的瞬时水孔道来实现的: 1) 离子通过瞬时水孔道来完成跨膜转运在理论上是合理的。瞬时水孔道使离子跨膜转运避免了与细胞膜内侧的脂肪烃链的不利接触, 可极大地降低穿越膜所需的自由能。2) 分子动力学模拟实验结果表明, DMSO 具有在膜上诱导出瞬时水孔道的能力。3) 在分子动力学模拟中, 可直接观察到离子经 DMSO 在膜上诱导出的瞬时孔道从胞内跨膜渗漏到胞外的过程^[18]。4) 最近的实验研究显示 DMSO 可引起铊离子(Tl^+)的瞬时内流, 暗示离子的跨膜转运不可能是通过相似相容扩散机制起作用; 而且, DMSO 引起的 Tl^+ 内流不受 K^+ 离子通道非特异性阻断剂四乙基铵 (tetraethylammonium, TEA) 和 Na^+/K^+ 泵特异性阻断剂的影响, 暗示 Tl^+ 的内流不是通过细胞膜上的主要 K^+ 转运蛋白而实现的。5) DMSO 不仅能引起 Tl^+ 的内流, 也能引起 Ca^{2+} 的内流^[26], 这一结果与瞬时水孔道没有离子选择性的理论相一致。综合以上证据可以得出, DMSO 诱导的瞬时水孔道是 DMSO 引起离子通透性增加的关键。

分子动力学模拟研究指出, 在 10%~30%摩尔百分比的浓度范围内, DMSO 在膜上能诱导出瞬时水孔道^[17,18]。而离子成像的实验研究结果却显示, DMSO 在体积百分比为 0.1%~4%的浓度范围内引起 Tl^+ 和 Ca^{2+} 的瞬时内流, 其中的浓度约为 0.04%~0.17%摩尔百分比^[26]。这个浓度远低于分子动力学模拟中 DMSO 的浓度。引起这种差异的一个主要原因可能是时间尺度问题。成像实验研究的时间尺度是 s, 而分子动力学模拟的尺度是 ns, 两种

研究的时程相差亿倍。而分子模拟的研究已表明, 不同时程的分子动态模拟结果能极大地影响最后的结果。例如, 分子动态模拟实验结果显示, 在 20 ns 级别的时程记录中, 需要 10% 以上摩尔百分比的 DMSO 才能诱导出瞬时水性孔道; 而在 5 ns 级别的时程记录中, 则要求 DMSO 的浓度大于或等于 15% 摩尔百分比^[18], 这些结果提示, 分子动态模拟的时程愈长, 结果愈可靠。另一方面, 细胞膜上存在着大量的膜蛋白, 而分子动力学模拟的是脂质双分子层, 不包含蛋白质分子。这些因素都有可能引起分子动力学模拟与实验结果的差异。更长时间的分子动力学模拟及对更像细胞膜的脂双层膜的模拟可望解决这些疑问。

参考文献:

- Wood DC, Wood J. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci*, 1975, 243: 7~19
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65: 1035~1041
- Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 603~618
- McGann LE, Walterson ML. Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone. *Cryobiology*, 1987, 24: 11~16
- Kasai M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. *Reprod Med Biol*, 2002, 1: 19
- Ahkong QF, Fisher D, Tampion W, Lucy JA. Mechanisms of cell fusion. *Nature*, 1975, 253(5488): 194~195
- David NA. The pharmacology of dimethyl sulfoxide. *Annu Rev Pharmacol*, 1972, 12: 353~374
- Li L, Shen W, Min L, Dong H, Sun Y, Pan Q. Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide sperm mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev*, 2006, 18: 689~695
- Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 14: 101~114
- Mittal A, Sara UV, Ali A. The effect of penetration enhancers on permeation kinetics of nitrendipine in two different skin models. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31: 1766~1772
- Guillard EC, Tfayli A, Laugel C. Molecular interactions of penetration enhancers within ceramides organization: A FTIR approach. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 36: 192~199
- Zafar S, Ali A, Aqil M, Ahad A. Transdermal drug delivery of labetalol hydrochloride: Feasibility and effect of penetration enhancers. *J Pharm Bioallied Sci*, 2010, 2: 321~324
- Wang H, Zhong CY, Wu JF, Huang YB, Liu CB. Enhancement of TAT cell membrane penetration efficiency by dimethyl sulphoxide. *J Control Release*, 2010, 143: 64~70
- Yu ZW, Quinn PJ. Solvation effects of dimethyl sulphoxide on the structure of phospholipid bilayers. *Biophys Chem*, 1998, 70(1): 35~39
- Smondyrev AM, Berkowitz ML. Molecular dynamics simulation of DPPC bilayer in DMSO. *Biophys J*, 1999, 76(5): 2472~2478
- Sum AK, de Pablo JJ. Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers. *Biophys J*, 2003, 85(6): 3636~3645
- Notman R, Noro M, O'Malley B, Anwar J. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 13982~13983
- Gurtovenko AA, Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: The molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J Phys Chem B*, 2007, 111(35): 10453~10460
- Gurtovenko AA, Anwar J. Ion transport through chemically induced pores in protein-free phospholipid membranes. *J Phys Chem B*, 2007, 111(47): 13379~13382
- Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Controlled Release*, 1987, 6: 85~97
- Notman R, den Otter WK, Noro MG, Briels WJ, Anwar J. The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide bilayers simulated by molecular dynamics. *Biophys J*, 2007, 93: 2056~2068
- Notman R, Anwar J, Briels WJ, Noro MG, den Otter WK. Simulations of skin barrier function: Free energies of hydrophobic and hydrophilic transmembrane pores in ceramide bilayers. *Biophys J*, 2008, 95(10): 4763~4771
- Bordi F, Cametti C, Naglieri A. Ion permeation across model lipid membranes: A kinetic approach. *J Phys Chem*, 2000, 104: 5318~5323
- Jansen M, Blume A. A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chains. *Biophys J*, 1995, 68: 997~1008
- Heimburg T. Lipid ion channels. *Biophys Chem*, 2010, 150 (1-3): 2~22
- He F, Liu W, Zheng S, Zhou L, Ye B, Qi Z. Ion transport through dimethyl sulfoxide (DMSO) induced transient water pores in cell membranes. *Mol Mem Biol*, 2012, 29(3-4): 107~113

Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide on Biological Membranes

FANG Zhicong¹, QI Zhi²

1. School of Automotive and Electronic Engineering of Xichang College, Xichang, Sichuan 615013, China;

2. Department of physiology, Medical College of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31070741, 81000560)

Received: Mar 23, 2012 Accepted: Apr 26, 2012

Corresponding author: Fang Zhicong, Tel : +86(834)2580103, E-mail: fangzc@sohu.com
QI Zhi, Tel : +86(592)2181330, E-mail: qizhi@xmu.edu.cn

Abstract: Dimethyl sulphoxide (DMSO) is widely used in biology, chemistry and Pharmacy. Due to its ability to enhance the membrane permeability, DMSO is frequently applied to facilitate the transport of active molecules across the biological membranes. This mini-review presents the evidence of both the theoretical and experimental analyses for the mechanism of how DMSO increases membrane permeability, especially, molecular dynamics simulations and experimental evidence that predicts that DMSO induces transient water pores in biological membranes.

Key Words: Biological membrane; Dimethyl sulfoxide; Ion permeation; Water pore

DOI : 10.3724/SP.J.1260.2012.20046